

29.08.03

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 3月31日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-096371  
Application Number:

[ST. 10/C]: [JP2003-096371]

出願人 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社  
Applicant(s): 第一製薬株式会社

REC'D 17 OCT 2003

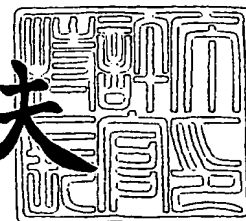
WIPO

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月 3日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP03-1021

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61P 3/10  
C12N 09/50  
C12Q 01/37

【発明の名称】 ヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  の分解方法、分解阻害方法および分解阻害剤

【請求項の数】 57

【発明者】

【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西 1 丁目 1 6 番 1 3 号  
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内

【氏名】 工藤 玄

【特許出願人】

【識別番号】 500520628

【氏名又は名称】 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000002831

【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  の分解方法、分解阻害方法および分解阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 カルシウムの存在下、カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1  $\alpha$ ; HNF-1  $\alpha$ ) を共存させることを特徴とする、HNF-1  $\alpha$  の分解方法。

【請求項 2】 カルシウム濃度によりヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1  $\alpha$ ; HNF-1  $\alpha$ ) の分解程度を変えることを特徴とする、HNF-1  $\alpha$  の分解方法。

【請求項 3】 カルシウムの存在下、m-カルパインおよび/または  $\mu$ -カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1  $\alpha$ ; HNF-1  $\alpha$ ) を共存させることを特徴とする、HNF-1  $\alpha$  の分解方法。

【請求項 4】 カルパイン活性を阻害することを特徴とするヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1  $\alpha$ ) の分解阻害方法。

【請求項 5】 カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1  $\alpha$ ; HNF-1  $\alpha$ ) の切断を阻害することを特徴とする HNF-1  $\alpha$  の分解阻害方法。

【請求項 6】 少なくともカルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1  $\alpha$ ; HNF-1  $\alpha$ ) を含む生体外試料をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、HNF-1  $\alpha$  の分解阻害方法。

【請求項 7】 少なくともカルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1  $\alpha$ ; HNF-1  $\alpha$ ) を発現している細胞をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、HNF-1  $\alpha$  の分解阻害方法。

【請求項 8】 細胞が膵臓  $\beta$  細胞である請求項 7 に記載の HNF-1  $\alpha$  の分解阻

害方法。

【請求項 9】 細胞が哺乳動物中に担持されている細胞である請求項 7 に記載の HNF-1 $\alpha$  の分解阻害方法。

【請求項 10】 カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、HNF-1 $\alpha$  を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる 1 つ以上の物質である請求項 6 または 7 に記載の HNF-1 $\alpha$  の分解阻害方法。

【請求項 11】 カルパインインヒビターが、N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH<sub>2</sub>F、Mu-Val-HPh-CH<sub>2</sub>F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH<sub>2</sub>Cl または Z-Val-Phe-CHO である請求項 10 に記載の HNF-1 $\alpha$  の分解阻害方法。

【請求項 12】 カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインによる HNF-1 $\alpha$  の切断認識部位の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求項 6 または 7 に記載の HNF-1 $\alpha$  の分解阻害方法。

【請求項 13】 カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうちの連続する 3 つ以上のアミノ酸残基からなり且つカルパインによる HNF-1 $\alpha$  の切断認識部位の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求項 6 または 7 に記載の HNF-1 $\alpha$  の分解阻害方法。

【請求項 14】 カルパインによる HNF-1 $\alpha$  の切断認識部位が、Leu-Tyr、Leu-Met、Leu-Arg、Val-Tyr、Val-Met および Val-Arg からなる群より選ばれるものである請求項 13 に記載の HNF-1 $\alpha$  の分解阻害方法。

【請求項 15】 カルパインが m-カルパインおよび/または  $\mu$ -カルパインである請求項 4 から 14 のいずれか 1 項に記載の HNF-1 $\alpha$  の分解阻害方法。

【請求項 16】 カルパインを有効成分として含んでなるヘパトサイトヌクレアーファクター 1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ) 分解剤。

【請求項 17】 カルパインが m-カルパインおよび/または  $\mu$ -カルパインで

ある請求項 16 に記載の HNF-1 $\alpha$  分解剤。

【請求項 18】 カルパイン活性を阻害することを特徴とするヘパトサイトヌクレアーファクター 1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ) 分解阻害剤。

【請求項 19】 カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター 1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) の切断を阻害することを特徴とする HNF-1 $\alpha$  分解阻害剤。

【請求項 20】 カルパイン活性を阻害する物質を有効成分として含んでなるヘパトサイトヌクレアーファクター 1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) 分解阻害剤。

【請求項 21】 カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、HNF-1 $\alpha$  を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる 1 つ以上の物質である請求項 20 に記載の HNF-1 $\alpha$  分解阻害剤。

【請求項 22】 カルパインインヒビターが、カルパインインヒビターが、N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH<sub>2</sub>F、Mu-Val-HPh-CH<sub>2</sub>F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH<sub>2</sub>Cl または Z-Val-Phe-CHO である請求項 21 に記載の HNF-1 $\alpha$  分解阻害剤。

【請求項 23】 カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインによる HNF-1 $\alpha$  の切断認識部位の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求項 20 に記載の HNF-1 $\alpha$  分解阻害剤。

【請求項 24】 カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうちの連続する 3 つ以上のアミノ酸残基からなり且つカルパインによる HNF-1 $\alpha$  の切断認識部位の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求項 20 に記載の HNF-1 $\alpha$  分解阻害剤。

【請求項 25】 カルパインによる HNF-1 $\alpha$  の切断認識部位が、Leu-Tyr、Leu-Met、Leu-Arg、Val-Tyr、Val-Met およ

びVal-Argからなる群より選ばれるものである請求項24に記載のHNF-1 $\alpha$ 分解阻害剤。

【請求項26】 カルパインがm-カルパインおよび／または $\mu$ -カルパインである請求項18から25のいずれか1項に記載のHNF-1 $\alpha$ の分解阻害剤。

【請求項27】 カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) の分解を阻害することを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

【請求項28】 カルシウム濃度によりヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) の分解程度を変えることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生調節方法。

【請求項29】 m-カルパインおよび／または $\mu$ -カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) の分解を阻害することを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生調節方法。

【請求項30】 請求項4から15のいずれか1項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

【請求項31】 請求項4から15のいずれか1項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子および／またはグルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

【請求項32】 請求項4から15のいずれか1項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項33】 請求項4から15のいずれか1項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項34】 請求項4から15のいずれか1項に記載の阻害方法を用いるこ

とを特徴とする、インシュリンおよび／またはグルコーストランスポーター2の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項35】 請求項4から15のいずれか1項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法。

【請求項36】 請求項4から15のいずれか1項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、肝細胞腺腫または肝細胞癌の防止方法および／または治療方法。

【請求項37】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

【請求項38】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子および／またはグルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

【請求項39】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項40】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項41】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、インシュリンおよび／またはグルコーストランスポーター2の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項42】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法。

【請求項43】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、肝細胞腺腫または肝細胞癌の防止方法および／または治療方法。

【請求項44】 請求項18から26のいずれか1項に記載の阻害剤を含んでなる、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤。



【請求項 45】 請求項 18 から 26 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を含んでなる、インシュリン遺伝子および／またはグルコーストランスポーター 2 遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤。

【請求項 46】 請求項 18 から 26 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を含んでなる医薬組成物。

【請求項 47】 請求項 18 から 26 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を含んでなる、HNF-1 $\alpha$  の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 48】 請求項 18 から 26 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を含んでなる、HNF-1 $\alpha$  が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 49】 請求項 18 から 26 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を含んでなる、インシュリンおよび／またはグルコーストランスポーター 2 の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 50】 請求項 18 から 26 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を含んでなる、糖尿病の防止剤および／または治療剤。

【請求項 51】 請求項 18 から 26 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を含んでなる、肝細胞腺腫または肝細胞癌の防止剤および／または治療剤。

【請求項 52】 カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター 1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによる HNF-1 $\alpha$  の切断を可能にする条件下、カルパインおよび／または HNF-1 $\alpha$  と被検化合物を接触させ、カルパインによる HNF-1 $\alpha$  の分解を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによる HNF-1 $\alpha$  の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法。

【請求項 53】 カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター 1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによる HNF-1 $\alpha$  の切断を可能にする条件下、カルパインおよび／または HNF-1 $\alpha$  と被検化合物を

接触させ、HNF-1 $\alpha$ 量またはHNF-1 $\alpha$ 分解物量を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによるHNF-1 $\alpha$ の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法。

【請求項54】 カルパインが、m-カルパインまたは $\mu$ -カルパインである請求項52または53に記載の同定方法。

【請求項55】 請求項52から54のいずれか1項に記載の同定方法で同定された化合物。

【請求項56】 カルパイン、カルパインをコードするポリヌクレオチドおよびカルパインをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ )、HNF-1 $\alpha$ をコードするポリヌクレオチドおよびHNF-1 $\alpha$ をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キット。

【請求項57】 カルパインが、m-カルパインまたは $\mu$ -カルパインである請求項56に記載の試薬キット。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

#### 【産業上の利用分野】

本発明は、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ) (以下、HNF-1 $\alpha$ と略称する。)の分解および該分解の阻害に関する。より具体的にはカルパイン (calpain)、好ましくはm-カルパインまたは $\mu$ -カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解方法および分解剤に関する。また、カルパインによる、好ましくはm-カルパインまたは $\mu$ -カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解阻害方法および分解阻害剤に関する。さらに、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物、例えばインシュリン遺伝子やグルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法および産生促進剤に関する。また、HNF-1 $\alpha$ の分解に起因する疾患、例えば糖尿病あるいは肝細胞腺腫や肝細胞癌の防止方法および／または

治療方法並びに防止剤および／または治療剤に関する。さらに、カルパインによる HNF-1 $\alpha$  の分解を阻害する化合物の同定方法および該同定方法により同定された化合物に関する。また、カルパイン、HNF-1 $\alpha$ 、これらをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターを含んでなる試薬キットに関する。

## 【0002】

### 【従来の技術】

HNF-1 $\alpha$  はトランスクリプションファクター 1 (TCF-1) とも呼ばれる転写因子であり、肝臓、腎臓、および膵臓の $\beta$ 細胞などで発現している。HNF-1 $\alpha$  は、種々の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーに結合し、当該遺伝子の転写を活性化する。例えば、膵臓の $\beta$ 細胞においてヘパトサイトヌクレアーファクター 4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ) やインシュリンプロモーターファクター 1 (IPF-1) などと転写因子ネットワークを形成し (非特許文献 1)、IPF-1 や HNF-4 $\alpha$  の転写を制御している (非特許文献 2)。また、HNF-1 $\alpha$  が、グルコーストランスポーター 2 (GLUT2)、インシュリン、およびグルコキナーゼ (Glucokinase) などの糖代謝関連遺伝子の発現を制御していることを示唆するデータが開示されている (非特許文献 3)。例えば、HNF-1 $\alpha$  が GLUT2 遺伝子のプロモーター領域に結合してその転写活性を亢進することが報告されている (非特許文献 3)。また、HNF-1 $\alpha$  がインシュリン遺伝子のプロモーターの A3 領域に結合してその転写活性を亢進すること (非特許文献 4 および非特許文献 5)、あるいはドミナントネガティブ体の HNF-1 $\alpha$  は $\beta$ 細胞の細胞株でインシュリン分泌を低下させたことが報告されている (非特許文献 4)。一方、HNF-1 $\alpha$  遺伝子は、遺伝性 2 型糖尿病 MODY3 (Maturity-onset diabetes of the young 3) の原因遺伝子であることが明らかにされている (非特許文献 6)。

## 【0003】

また、HNF-1 $\alpha$  は肝細胞腺腫 (liver adenoma) との関連も報告されており、アミノ変異による HNF-1 $\alpha$  の不活性化が肝細胞腺腫の原因となることが示されている (非特許文献 7)。肝細胞腺腫は肝細胞癌 (hepa

t o c e l l u l a r c a r c i n o m a) へ形質転換する危険性を有する腫瘍なので、HNF-1 $\alpha$ の不活性化は肝細胞腺腫、ひいては肝細胞癌を誘発すると考えられる。HNF-1 $\alpha$ のノックアウトマウスでは肝細胞の異常増殖による著しい肝肥大が認められている（非特許文献8）。

#### 【0004】

一方、カルパイン（EC 3. 4. 22. 17）は、カルシウム依存性システインプロテアーゼであり、蛋白質を限定的に切断してその構造や機能を変化させる酵素である。カルパインには、構造的特徴、組織局在およびカルシウム要求性などによって分類される多くのアイソザイムが知られており、これらからなるスーパーファミリーを構成している。

#### 【0005】

m-カルパインは、カルパインスーパーファミリーの1つであり、カルパイン2とも呼ばれ、多くの組織で発現している（非特許文献9）。m-カルパインは1 mM程度のカルシウム濃度で活性化され、酵素活性を発現する。

#### 【0006】

$\mu$ -カルパインは、カルパイン1とも呼ばれ、m-カルパインと同様に多くの組織で発現している（非特許文献9および非特許文献10）。 $\mu$ -カルパインは、m-カルパインと比較してカルシウム要求性が低く、数十 $\mu$ M程度のカルシウム濃度で活性化され、その酵素活性を発現する。

#### 【0007】

m-カルパインおよび $\mu$ -カルパインにより分解される蛋白質としては、p 53、レチノイドXレセプター（RXR）など多くの転写因子が報告されている（非特許文献11、非特許文献12および非特許文献13）。カルパインにより分解される蛋白質には、カルパインによって優先的に切断されるアミノ酸モチーフが存在する（非特許文献14）。例えば、ロイシン残基（L e u）またはバリン残基（V a l）などの疎水性アミノ酸残基に続く、チロシン残基（T y r）、メチオニン残基（M e t）またはアルギニン残基（A r g）とそれに続くアミノ酸残基との間で切断される。現在、いくつかのカルパイン阻害剤が市販されているが、このような切断モチーフを含むアミノ酸配列からなるペプチドN-A c e t

y l - L e u - L e u - M e t - C H O が m - カルパインの競合阻害剤として知られている（非特許文献 15）（CALBIOCHEM 社）。また N - A c e t y l - L e u - L e u - N l e - C H O は、 $\mu$  - カルパインの競合阻害剤として知られている（非特許文献 16）（CALBIOCHEM 社）。その他、不可逆的なカルパイン阻害剤である Z - L e u - L e u - T y r - C H <sub>2</sub> F（非特許文献 17）や M u - V a l - H P h - C H <sub>2</sub> F（非特許文献 18）、可逆的なカルパイン阻害剤である 4 - フルオロフェニルスルホニル（F l u o r o p h e n y l s u l f o n y l） - V a l - L e u - C H O（非特許文献 19）、および L e u - L e u - P r o - クロロメチルケトン（C h l o r o m e t h y l k e t o n e）（非特許文献 20）などが市販されている（CALBIOCHEM 社）。

#### 【0008】

カルパインは細胞機能の調節に関与しているため、カルパインの活性制御の不全やその遺伝子の欠損などにより種々の疾患が引き起こされる。例えば、いくつかの糖尿病モデル動物では組織のカルパイン活性が亢進している（非特許文献 21 および非特許文献 22）。カルパイン阻害剤により膵島におけるグルコースに対するインシュリン分泌応答が増強されたことから、インシュリンの分泌と作用の調節へのカルパインの関与が示唆されている（非特許文献 23）。また、カルパイン 10 遺伝子の変異と 2 型糖尿病罹患率との間の関連性が指摘されている（非特許文献 24 および非特許文献 25）。

#### 【0009】

一方、m - カルパインおよび  $\mu$  - カルパインは、外傷性脳損傷、アルツハイマー病、脳卒中および白内障に関与していることが示唆されている（非特許文献 10）。

#### 【0010】

以下に、本明細書で引用した文献を列記する。

【非特許文献 1】 Shih, D. Q. et al., 「Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America」 200

1年, 第98巻, p. 14189-14191。

【非特許文献2】Shih, D. Q. et al., 「Diabetes」2001年, 第50巻, p. 2472-2480。

【非特許文献3】Ban, N. . et al., 「Diabetes」2002年, 第51巻, p. 1409-1418。

【非特許文献4】「EMBO Journal」1998年, 第17巻, 第22号, p. 6701-6713。

【非特許文献5】「Biochemical Biophysical Research communications」1999年, 第263巻, p. 566-569。

【非特許文献6】Yamagata, K. et al., 「Nature」1996年, 第384巻, p. 455-457。

【非特許文献7】Bluteau, O. et al., 「Nature genetics」2002年, 第32巻, p. 312-315。

【非特許文献8】Pontoglio, M. et al., 「Cell」1996年, 第84巻, p. 575-585。

【非特許文献9】反町洋之, 「生化学」2000年, 第72巻, 第11号, p. 1297-1315。

【非特許文献10】Huang, Y. et al., 「TRENDS in Molecular Medicine」2001年, 第7巻, p. 355-362。

【非特許文献11】Matsushima-Nishiwaki, R. et al., 「Biochemical and Biophysical Research Communications」1996年, 第225巻, p. 946-951。

【非特許文献12】Pariat, M., et al., 「Molecular and Cellular Biology」1997年, 第17巻, p. 2806-2815。

【非特許文献13】Watt, F. et al., 「Nucleic Acid

s Research] 1993年, 第21巻, p. 5092-5100。

【非特許文献14】Sasaki, T. et al., 「Journal of Biological Chemistry」1984年, 第259巻, p. 12489-12494。

【非特許文献15】Ravid, T. et al., 「Journal of Biological Chemistry」2000年, 第275巻, p. 35840-。

【非特許文献16】Debiasi, R. L. et al., 「Journal of Virology」1999年, 第73巻, p. 659-。

【非特許文献17】Dutt, P. et al., 「FEBS Letter」1998年, 第436巻, p. 367-。

【非特許文献18】Esser, R. E. et al., 「Arthritis and Rheumatism」1994年, 第37巻, p. 236-。

【非特許文献19】Nath, R. et al., 「Biochemical and Biophysical Research Communications」2000年, 第274巻, p. 16-。

【非特許文献20】Sasaki, T. et al., 「Journal of Biochemistry」1986年, 第99巻, p. 173-。

【非特許文献21】Brooks, B. A. et al., 「American Journal of Physiology」1983年, 第244巻, 第3号, p. C175-181。

【非特許文献22】Kobayashi, S. et al., 「Endocrinologia Japonica」1989年, 第36巻, 第6号, p. 833-844。

【非特許文献23】Sreeman, S. K. et al., 「Diabetes」2001年, 第50巻, p. 2013-2020。

【非特許文献24】Horikawa, Y. et al., 「Nature Genetics」2000年, 第26巻, p. 163-175。

【非特許文献25】Baier, L. J. et al., 「Journal o

f Clinical Investigation」2000年, 第106巻, p. R69-73。

【非特許文献26】Ulmer, K. M. 「Science」1983年, 第219巻, p. 666-671。

【非特許文献27】「ペプチド合成」(日本国)、丸善株式会社、1975年、

【非特許文献28】「ペプチド合成(Peptide Synthesis)」(米国)、インターサイエンス、1996年。

【非特許文献29】Bjorklund, A. et al., 「Diabetes」2000年, 第49巻, p. 1840-1848。

【非特許文献30】Maruyama, K. et al., 「International Journal of Molecular Medicine」2000年, 第5巻, p. 269-273。

#### 【0011】

##### 【発明が解決しようとする課題】

上記の如くHNF-1 $\alpha$ が種々の遺伝子の転写因子として作用することから、HNF-1 $\alpha$ の減少や機能欠損は、当該遺伝子の発現を低減させ、その結果当該遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する生体機能の異常を引き起こし、さらには、当該遺伝子産物の減少に起因する疾患の原因になると考えられる。例えば、HNF-1 $\alpha$ の減少や機能欠損により、膵臓の $\beta$ 細胞において上記転写因子ネットワークが破綻し、糖代謝の異常が引き起こされることが考えられる。HNF-1 $\alpha$ の減少や機能欠損の原因の1つとしては、例えばHNF-1 $\alpha$ の分解が挙げられる。

#### 【0012】

したがって、HNF-1 $\alpha$ の分解を阻害することにより、HNF-1 $\alpha$ の機能、例えば転写因子としての機能を促進することが可能である。さらに、HNF-1 $\alpha$ の分解を阻害することにより、HNF-1 $\alpha$ の減少や機能欠損に起因する疾患、あるいはHNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止および／または治療が可能になる。

#### 【0013】

かかる現状において本発明は、HNF-1 $\alpha$ の分解に関与する蛋白質を見出し



、HNF-1 $\alpha$ の分解に起因する疾患の防止手段および／または治療手段を提供することを目的とした。

#### 【0014】

##### 【課題解決のための手段】

上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、m-カルパインおよび $\mu$ -カルパインがHNF-1 $\alpha$ を分解することを明らかにし、本発明を完成した。

#### 【0015】

すなわち本発明は、

1. カルシウムの存在下、カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) を共存させることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ の分解方法、
2. カルシウム濃度によりヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) の分解程度を変えることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ の分解方法、
3. カルシウムの存在下、m-カルパインおよび／または $\mu$ -カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) を共存させることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ の分解方法、
4. カルパイン活性を阻害することを特徴とするヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ) の分解阻害方法、
5. カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) の切断を阻害することを特徴とするHNF-1 $\alpha$ の分解阻害方法、
6. 少なくともカルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) を含む生体外試料をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ の分解阻害方法、
7. 少なくともカルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepa

t o c y t e n u c l e a r f a c t o r 1  $\alpha$ ; HNF-1  $\alpha$ ) を発現している細胞をカルpain活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、HNF-1  $\alpha$  の分解阻害方法、

8. 細胞が膵臓 $\beta$ 細胞である前記7. のHNF-1  $\alpha$  の分解阻害方法、

9. 細胞が哺乳動物中に担持されていることを特徴とする細胞である前記7. のHNF-1  $\alpha$  の分解阻害方法、

10. カルpain活性を阻害する物質が、カルpainを認識する抗体、HNF-1  $\alpha$  を認識する抗体およびカルpainインヒビターから選ばれる1つ以上の物質である前記6. または7. のHNF-1  $\alpha$  の分解阻害方法、

11. カルpainインヒビターが、N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH<sub>2</sub>F、Mu-Val-HPh-CH<sub>2</sub>F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH<sub>2</sub>Cl または Z-Val-Phe-CHO である前記10. のHNF-1  $\alpha$  の分解阻害方法、

12. カルpain活性を阻害する物質が、カルpainによるHNF-1  $\alpha$  の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである前記6. または7. のHNF-1  $\alpha$  の分解阻害方法、

13. カルpain活性を阻害する物質が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり且つカルpainによるHNF-1  $\alpha$  の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである前記6. または7. のHNF-1  $\alpha$  の分解阻害方法、

14. カルpainによるHNF-1  $\alpha$  の切断認識部位が、Leu-Tyr、Leu-Met、Leu-Arg、Val-Tyr、Val-Met および Val-Arg からなる群より選ばれるものである前記13. のHNF-1  $\alpha$  の分解阻害方法、

15. カルpainがm-カルpainおよび/または $\mu$ -カルpainである前記4. から14. のいずれかのHNF-1  $\alpha$  の分解阻害方法、

16. カルpainを有効成分として含んでなるヘパトサイトヌクレアーファクタ

-1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ) 分解剤

、

17. カルパインがm-カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインである前記16. のHNF-1 $\alpha$ 分解剤、

18. カルパイン活性を阻害することを特徴とするヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ) 分解阻害剤、

19. カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) の切断を阻害することを特徴とするHNF-1 $\alpha$ 分解阻害剤、

20. カルパイン活性を阻害する物質を有効成分として含んでなるヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) 分解阻害剤、

21. カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、HNF-1 $\alpha$ を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる1つ以上の物質である前記20. のHNF-1 $\alpha$ 分解阻害剤、

22. カルパインインヒビターが、カルパインインヒビターが、N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH<sub>2</sub>F、Mu-Val-HPhe-CH<sub>2</sub>F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH<sub>2</sub>ClまたはZ-Val-Phe-CHOである前記21. のHNF-1 $\alpha$ 分解阻害剤、

23. カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである前記20. のHNF-1 $\alpha$ 分解阻害剤、

24. カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり且つカルパインによるHNF-1 $\alpha$ の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドであ

る前記20. のHNF-1 $\alpha$ 分解阻害剤、

25. カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の切断認識部位が、Leu-Tyr、Leu-Met、Leu-Arg、Val-Tyr、Val-MetおよびVal-Argからなる群より選ばれるものである前記24. のHNF-1 $\alpha$ 分解阻害剤、

26. カルパインがm-カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインである前記18. から25. のいずれかのHNF-1 $\alpha$ の分解阻害剤、

27. カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) の分解を阻害することを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法、

28. カルシウム濃度によりヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) の分解程度を変えることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生調節方法、

29. m-カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) の分解を阻害することを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生調節方法、

30. 前記4. から15. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法、

31. 前記4. から15. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子および/またはグルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法、

32. 前記4. から15. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ の分解に起因する疾患の防止方法および/または治療方法、

33. 前記4. から15. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および/または治療方法、

34. 前記4. から15. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、インシュリンおよび／またはグルコーストランスポーター2の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

35. 前記4. から15. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法、

36. 前記4. から15. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、肝細胞腺腫または肝細胞癌の防止方法および／または治療方法、

37. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法、

38. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子および／またはグルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法、

39. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

40. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

41. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、インシュリンおよび／またはグルコーストランスポーター2の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

42. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法、

43. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、肝細胞腺腫または肝細胞癌の防止方法および／または治療方法、

44. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤、

45. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる、インシュリン遺伝子および／またはグルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤、

46. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる医薬組成物、
47. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる、HNF-1 $\alpha$ の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、
48. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、
49. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる、インシュリンおよび／またはグルコーストランスポーター2の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、
50. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる、糖尿病の防止剤および／または治療剤、
51. 前記18. から26. のいずれかの阻害剤を含んでなる、肝細胞腺腫または肝細胞癌の防止剤および／または治療剤、
52. カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の切断を可能にする条件下、カルパインおよび／またはHNF-1 $\alpha$ と被検化合物を接触させ、カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによるHNF-1 $\alpha$ の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法、
53. カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; HNF-1 $\alpha$ ) の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の切断を可能にする条件下、カルパインおよび／またはHNF-1 $\alpha$ と被検化合物を接触させ、HNF-1 $\alpha$ 量またはHNF-1 $\alpha$ 分解物量を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによるHNF-1 $\alpha$ の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法、

54. カルパインが、 $m$ -カルパインまたは $\mu$ -カルパインである前記52. または53. の同定方法、

55. 前記52. から54. のいずれかの同定方法で同定された化合物、

56. カルパイン、カルパインをコードするポリヌクレオチドおよびカルパインをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、ヘパトサイトヌクレアーファクター $1\alpha$  (hepatocyte nuclear factor  $1\alpha$ ; HNF- $1\alpha$ )、HNF- $1\alpha$ をコードするポリヌクレオチドおよびHNF- $1\alpha$ をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キット、

57. カルパインが、 $m$ -カルパインまたは $\mu$ -カルパインである前記56. の試薬キット、  
からなる。

#### 【0016】

##### 【発明の実施の形態】

本発明においては、 $m$ -カルパインまたは $\mu$ -カルパインがHNF- $1\alpha$ を分解することを見出した。 $m$ -カルパインまたは $\mu$ -カルパインによるHNF- $1\alpha$  (配列番号1) の切断認識部位は、下記の9箇所であると考えられる (図1) : アミノ酸配列第162番目のロイシン (L) に続くチロシン (Y) とそれに続くトレオニン (T) との間; 第167番目のバリリン (V) に続くアルギニン (R) とそれに続くリジン (K) との間; 第262番目のバリリン (V) に続くアルギニン (R) とそれに続くバリリン (V) との間; 第264番目のバリリン (V) に続くチロシン (Y) とそれに続くアスパラギン (N) との間; 第320番目のバリリン (V) に続くアルギニン (R) とそれに続くアミノ酸残基 (不確定であるが、チロシンであるという報告がある) との間; 第411番目のバリリン (V) に続くメチオニン (M) とそれに続くトレオニン (T) との間; 第476番目のロイシン (L) に続くメチオニン (M) とそれに続くプロリン (P) との間; 第502番目のロイシン (L) に続くチロシン (Y) とそれに続くセリン (S) との間; および第597番目のロイシン (L) に続くチロシン (Y) とそれに続くグルタミン (Q) との間。

## 【0017】

本明細書においてはアミノ酸を1文字表記または3文字表記することがある。また、ペプチドとは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドを意味し、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称する短鎖ペプチド、並びにポリヌクレオチドや蛋白質などの長鎖ペプチドを包含する。

## 【0018】

上記知見に基づいて達成した本発明において、カルパインはカルパインスーパーファミリーに属するプロテアーゼを全て包含するものである。カルパインスーパーファミリーに属するプロテアーゼとしては、 $m$ -カルパイン、 $\mu$ -カルパイン、カルパイン3、カルパイン5、カルパイン8、カルパイン9、カルパイン10、カルパイン11、カルパイン12およびカルパイン13などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは $m$ -カルパインまたは $\mu$ -カルパインである。 $\mu$ -カルパインは $m$ -カルパインと比較してカルシウム要求性が低く、より低濃度のカルシウムにより活性化される。そのため、 $\mu$ -カルパインは $m$ -カルパインと比較してカルシウム濃度上昇により活性化され易く、生体内で主に作用している可能性が考えられることから、より好ましくは $\mu$ -カルパインである。これら各プロテアーゼを使用するときは、これらを単独で用いてもよいし、2つ以上を組合せて用いることもできる。

またカルパインは、HNF-1 $\alpha$ のみを特異的に分解するものに限らず、複数の蛋白質、例えば複数の転写因子の分解に関与するものであってもよい。

## 【0019】

本発明においては、HNF-1 $\alpha$ の分解剤および分解方法を提供する。当該HNF-1 $\alpha$ の分解剤は、カルパインを有効成分として含んでなる。また、当該HNF-1 $\alpha$ の分解方法はカルパインとHNF-1 $\alpha$ を共存させることを特徴とする。カルパインはカルシウム依存性プロテアーゼであるため、該共存はカルシウム存在下で行なうことが好ましい。カルシウム濃度は、カルパインのカルシウム要求性を考慮し、カルパインを活性化してそれらの酵素活性を誘発できる濃度を用いる。例えば、 $m$ -カルパインを活性化するためには、好ましくは約1 mM以



上のカルシウム濃度が好適である。 $\mu$ -カルパインを活性化するためには、好ましくは約10  $\mu$ M以上、より好ましくは約20  $\mu$ M以上、さらに好ましくは約30  $\mu$ M以上のカルシウム濃度が好適である。また、カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解にはカルシウム濃度依存性があるため、カルシウム濃度を調節することによりカルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解程度を所望の程度に調節することができる。かかるカルシウム濃度の調節を特徴とするHNF-1 $\alpha$ の分解方法も本発明の範囲に包含される。また、カルパインとHNF-1 $\alpha$ を少なくとも含んでなり、カルパインとHNF-1 $\alpha$ を共存させることを特徴とするHNF-1 $\alpha$ の分解系を構築することが可能である。

#### 【0020】

本発明に係るHNF-1 $\alpha$ の分解方法および分解系は、インビトロのものであってよく、インビボのものであってもよい。例えば、カルパインとHNF-1 $\alpha$ を、例えば試験管内やマルチウエルプレート内で、カルシウムの存在下で共存させて、HNF-1 $\alpha$ を分解させる分解方法および分解系が例示できる。あるいは、カルパインとHNF-1 $\alpha$ を共発現させた細胞を用いた分解方法および分解系を例示できる。発現に用いる細胞は、蛋白質の発現のために一般的に使用されている細胞を使用可能である。これら蛋白質の発現は、公知の遺伝子工学的手法を用いて実現することができる。かかる細胞を用いた分解方法および分解系において、細胞内カルシウム濃度を調節する、例えばカルパインが活性化する濃度に上昇させるためには、イオノフォアの使用が好適である。イオノフォアは、A23187など公知のものを用いることができる。また、非ヒト動物にカルパイン、さらにHNF-1 $\alpha$ の各遺伝子を自体公知の遺伝子工学的手法を用いて導入することにより、非ヒト動物におけるHNF-1 $\alpha$ の分解方法および分解系を提供することが可能である。

#### 【0021】

本発明において使用するカルパインおよびHNF-1 $\alpha$ は、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、これら蛋白質は、それらのN末端側やC末端側に別の蛋白質

やペプチドなどを、直接的にまたはリンカーペプチドなどを介して間接的に、遺伝子工学的的手法などを用いて付加することにより標識化したものであってもよい。好ましくは、カルパインとHNF-1 $\alpha$ の相互作用およびこれら蛋白質の機能、例えばカルパインとHNF-1 $\alpha$ の接触、カルパインの酵素活性およびHNF-1 $\alpha$ の転写因子機能などが阻害されないような標識化が望ましい。付加する蛋白質やペプチドなどとしては、例えばグルタチオン S-トランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、免疫グロブリンのFc断片、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagまたはExpress-tag、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ビオチン、グリーン蛍光蛋白質、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate)、フィコエリスリン (phycoerythrin)、あるいは放射性同位元素などが挙げられるが、これらに限定されない。標識化するとき、これら蛋白質やペプチドなどは単独で付加してもよいし複数を組合わせて付加することもできる。これら標識化に用いた蛋白質またはペプチドなどの物質自体、またはその機能を測定することにより、HNF-1 $\alpha$ の分解を検出することが可能である。また、遺伝子導入に用いるカルパインおよびHNF-1 $\alpha$ の各遺伝子は、ヒトcDNAライブラリーから自体公知の遺伝子工学的的手法により調製することができる。これら遺伝子を適当な発現ベクターDNA、例えば細菌プラスミド由来のベクターなどに自体公知の遺伝子工学的的手法で導入し、上記各遺伝子を含有するベクターを得て、遺伝子導入に利用することができる。遺伝子導入は、自体公知の遺伝子工学的的手法を用いて実施可能である。

#### 【0022】

上記HNF-1 $\alpha$ の分解剤、分解方法および分解系は、HNF-1 $\alpha$ の機能解明やHNF-1 $\alpha$ が関与する転写因子ネットワークについての研究、およびHNF-1 $\alpha$ の分解に起因する疾患、例えば糖尿病あるいは肝細胞腺腫や肝細胞癌におけるHNF-1 $\alpha$ やカルパインの関与についての分子レベルでの研究などに有用である。また、当該分解方法および分解系を用いて、HNF-1 $\alpha$ の分解を阻害する化合物の同定方法を構築することも可能である。

## 【0023】

本発明はまた、HNF-1 $\alpha$ 分解の阻害剤および阻害方法を提供する。該阻害剤および阻害方法は、カルパイン活性を阻害すること、またはカルパインによるHNF-1 $\alpha$ の切断を阻害することを特徴とする。カルパイン活性の阻害またはカルパインによるHNF-1 $\alpha$ 切断の阻害は例えば、カルパインの酵素活性を阻害することにより、またはカルパインとHNF-1 $\alpha$ の接触を阻害することにより実施できる。

## 【0024】

HNF-1 $\alpha$ 分解の阻害剤および阻害方法はまた、カルパイン活性を阻害する物質を用いて達成することができる。本発明の範囲には、カルパイン活性を阻害する物質を有効成分として含んでなるHNF-1 $\alpha$ 分解の阻害剤、およびカルパイン活性を阻害する物質を用いることを特徴とするHNF-1 $\alpha$ 分解の阻害方法が含まれる。カルパイン活性を阻害する物質により処理される対象物としては、少なくともカルパインとHNF-1 $\alpha$ を含む対象物、例えば少なくともこれらを含む生体外試料が挙げられる。また、少なくともカルパインとHNF-1 $\alpha$ を発現している細胞、例えば膵臓 $\beta$ 細胞など、およびかかる細胞を担持している哺乳動物なども当該対象物に含まれる。

## 【0025】

カルパイン活性を阻害する効果を有する物質の例としては、拮抗阻害効果を有するペプチド類、抗体および低分子化合物などが挙げられる。具体的には、カルパインインヒビターとして知られているN-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH<sub>2</sub>F、Mu-Val-HPh-CH<sub>2</sub>F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH<sub>2</sub>ClまたはZ-Val-Phe-CHOなどが例示できる。抗体としては、カルパインまたはHNF-1 $\alpha$ を認識する抗体であって、カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解を阻害する抗体が挙げられる。HNF-1 $\alpha$ を認識する抗体は、さらに好ましくはHNF-1 $\alpha$ の機能、例えば転写因子活性を阻害しないものが好適である。かかる抗体は、カ

ルパインまたはHNF-1 $\alpha$ 自体、またはこれらが相互作用する部位のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として自体公知の抗体作製法により得ることができる。低分子化合物としては、カルパインの酵素活性を阻害する化合物、好ましくは該酵素活性を特異的に阻害する化合物が挙げられる。かかる化合物は、例えば、本発明に係る分解方法または分解系を利用して、カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解を阻害するものを同定することにより得ることができる。カルパインを特異的に阻害するとは、カルパインを強く阻害するが、他の酵素は阻害しないか、弱く阻害することを意味する。

#### 【0026】

また、カルパインによるHNF-1 $\alpha$ 分解の阻害は、例えば両蛋白質が相互作用する部位のアミノ酸配列からなるペプチドを用いて実施可能である。かかるペプチドとして、HNF-1 $\alpha$ のアミノ酸配列（配列番号1）においてカルパインにより切断される部位、すなわち切断認識部位のアミノ酸配列を含むペプチドが例示できる。例えば、m-カルパインまたは $\mu$ -カルパインの切断認識部位のアミノ酸配列は、LY、LM、LR、VY、VMまたはVRであると考えられる。このような切断認識部位のアミノ酸配列を少なくとも1つ含むペプチドが好ましい。かかるペプチドは、カルパインによるHNF-1 $\alpha$ 分解を競合的に阻害すると考えられる。より好ましくは、HNF-1 $\alpha$ のアミノ酸配列（配列番号1）のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり、且つカルパインの切断認識部位のアミノ酸配列を含むペプチドが挙げられる。これらペプチドはさらに、酵素とペプチドの結合を安定化し、ペプチドが酵素から解離し難くするために通常よく使用される修飾、例えばC末端のアルデヒド化またはN末端のアセチル化などの修飾を施こしたものであってもよい。

#### 【0027】

上記ペプチドは、カルパインまたはHNF-1 $\alpha$ のアミノ酸配列から設計し、自体公知のペプチド合成法により合成したものから、カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解を阻害するものを選択することにより得ることができる。

#### 【0028】

このように特定されたペプチドに、1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付

加または挿入などの変異を導入したのも本発明の範囲に包含される。このような変異を導入したペプチドは、さらにカルパインによる HNF-1 $\alpha$  の切断を阻害するものが好ましい。変異を有するペプチドは天然に存在するものであってよく、また変異を導入したものであってもよい。欠失、置換、付加または挿入などの変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマー (Ulmer) の技術 (非特許文献 26) を利用できる。このような変異の導入において、当該ペプチドの基本的な性質 (物性、機能または免疫学的活性など) を変化させないという観点から、例えば、同族アミノ酸 (極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸など) の間での相互置換は容易に想定される。さらに、これら利用できるペプチドは、その構成アミノ基またはカルボキシル基などを、例えばアミド化修飾するなど、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

#### 【0029】

上記ペプチドは、ペプチド化学において知られる一般的な方法で製造できる。例えば、公知文献に記載の方法 (非特許文献 27 および非特許文献 28) が例示できるが、これらに限らず公知の方法が広く利用可能である。

#### 【0030】

本発明においてはまた、HNF-1 $\alpha$  が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生調節方法を提供可能である。産生調節方法の 1 つとしては、カルパインによる HNF-1 $\alpha$  の分解を阻害することを特徴とする該遺伝子産物の産生促進方法が挙げられる。具体的には、該産生促進方法は、上記 HNF-1 $\alpha$  分解阻害剤または HNF-1 $\alpha$  分解阻害方法を使用することにより達成できる。また、上記 HNF-1 $\alpha$  分解阻害剤を含んでなる、HNF-1 $\alpha$  が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤も本発明の範囲に包含される。産生調節方法の別の 1 つとしては、カルシウム濃度を調節して HNF-1 $\alpha$  の分解程度を所望の程度に調節することにより、当該遺伝子産物の産生を調節する方法が挙げられる。カルシウム濃度を高濃度にしてカルパインを活性化させることにより HNF-1 $\alpha$  を分解することができるため、当該遺伝子産物の産生を低下させることができる。カルシウム濃度を低濃度にしてカルパインの酵素活性を減弱させるこ

とにより、HNF-1 $\alpha$ の分解を阻害することができるため、当該遺伝子産物の産生を促進することができる。HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物としては、HNF-1 $\alpha$ の結合部位をプロモーターまたはエンハンサー内に有する遺伝子の遺伝子産物が挙げられる。具体的には、インシュリン遺伝子、GLUT2遺伝子、HNF-4 $\alpha$ 遺伝子およびIPF-1遺伝子などの遺伝子産物が例示できる。

#### 【0031】

さらに本発明においては、HNF-1 $\alpha$ の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、並びに当該疾患の防止方法および／または治療方法を提供する。本発明に係るHNF-1 $\alpha$ の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤は、上記HNF-1 $\alpha$ 分解阻害剤を含んでなる。本発明に係るHNF-1 $\alpha$ の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法は、上記HNF-1 $\alpha$ 分解阻害剤またはHNF-1 $\alpha$ 分解阻害方法を使用することにより達成できる。HNF-1 $\alpha$ の分解に起因する疾患としては、例えばHNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患が挙げられる。このような疾患として具体的には、糖代謝関連因子の減少に起因する疾患、例えばインシュリンの減少に起因する疾患などが例示できる。より具体的には、糖代謝異常による疾患、例えば糖尿病などが挙げられる。実際、マウスの膵臓ランゲルハンス島にカルパイン阻害剤を暴露させるとグルコース刺激によるインシュリン分泌が増加することが報告されている（非特許文献23）。しかし、この報告においては、カルパインとHNF-1 $\alpha$ の関連については開示されていない。また、膵島においては、高血糖状態が持続すると細胞内カルシウム濃度が上昇し、グルコース刺激性インシュリン分泌の脱感作が起こる（非特許文献29）。本発明における知見から、長期の高血糖による細胞内カルシウム濃度の上昇によりカルパインが活性化され、その結果HNF-1 $\alpha$ が分解されるために、膵臓 $\beta$ 細胞での転写因子ネットワークが破綻して糖代謝の異常が起き、ひいては2型糖尿病と同様の病態が誘発されるというカスケードが存在すると考えられる。本発明によれば、上記カスケードにおいてカルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解を阻害できるため、糖代謝の正常化を図り、糖尿病を防止および／または治療可能である。あるいは

、HNF-1 $\alpha$ と肝細胞腺腫との関連が報告されていることから、肝細胞腺腫ひいては肝細胞癌の防止および／または治療が可能である。

### 【0032】

本発明においてはまた、カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解を阻害する化合物の同定方法を提供する。該同定方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。また、本発明に係る分解系または分解方法を利用して、該同定方法を実施可能である。被検化合物としては、例えば化学ライブラリーや天然物由来の化合物、またはカルパインおよびHNF-1 $\alpha$ の一次構造や立体構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物などが挙げられる。あるいは、HNF-1 $\alpha$ のカルパインによる切断認識部位のペプチドの構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物なども被検化合物として好適である。

### 【0033】

具体的には、カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の切断を可能にする条件を選択し、当該条件下でカルパインおよび／またはHNF-1 $\alpha$ と被検化合物を接触させ、HNF-1 $\alpha$ の分解を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解を阻害する化合物を同定できる。カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の切断を可能にする条件としては、例えばカルパインを活性化する濃度のカルシウムの存在下であることが挙げられる。また、該条件はインビトロのものであってよく、インビボのものであってもよい。例えば、カルパインとHNF-1 $\alpha$ を共発現させた細胞を用いることもできる。カルパインおよび／またはHNF-1 $\alpha$ と被検化合物の接触は、カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解反応の前に行なってもよいし、当該反応に共存させることにより行なってもよい。ここでシグナルとは、そのもの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものを指し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものを指す。シグナルとしてはルシフェラーゼ、グリーン蛍光蛋白質、および放射性同位体など、マーカーとしては、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチ

ルトランスフェラーゼ遺伝子など、または検出用のエピトープタグ、例えば  $6 \times \text{His} - \text{tag}$  など、公知のものが利用できる。これらシグナルまたはマーカ―は、単独で使用してもよく、2つ以上を組合わせて用いてもよい。これらシグナルまたはマーカ―の検出方法は当業者には周知のものである。簡便には、 $\text{HNF} - 1 \alpha$  の分解は、 $\text{HNF} - 1 \alpha$  量または  $\text{HNF} - 1 \alpha$  分解物量の存在若しくは不存在および／または変化の測定により検出できる。 $\text{HNF} - 1 \alpha$  量または  $\text{HNF} - 1 \alpha$  分解物量の定量は、自体公知の蛋白質またはペプチドの検出方法、例えばウェスタンブロッティング法などを用いて実施できる。あるいは、 $\text{HNF} - 1 \alpha$  の分解の検出は、 $\text{HNF} - 1 \alpha$  の転写因子活性の存在若しくは不存在および／または変化の測定により行なうことができる。具体的には、例えば、 $\text{HNF} - 1 \alpha$  とカルパインを発現している細胞に、インシュリン遺伝子のプロモーター領域をその上流に組み込んだレポーター遺伝子を含むプラスミドをトランスフェクトし、被検化合物とこの細胞を接触させた場合のレポーター遺伝子の発現量を、当該被検化合物と接触させなかった場合のレポーター遺伝子の発現量と比較することにより行なうことができる。

#### 【0034】

上記同定方法で得られた化合物は、上記ペプチドと同様に  $\text{HNF} - 1 \alpha$  の分解阻害剤として利用可能である。上記ペプチドおよび／または上記化合物を含む阻害剤は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することにより、医薬組成物として調製可能である。医薬組成物の調製において、これらペプチドおよび／または化合物は、単独で使用することもできるし、複数を組み合わせて使用することも可能である。

#### 【0035】

本発明に係る  $\text{HNF} - 1 \alpha$  分解阻害剤、 $\text{HNF} - 1 \alpha$  が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物、例えばインシュリン遺伝子および／または  $\text{GLUT} 2$  遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤、並びに  $\text{HNF} - 1 \alpha$  の分解に起因する疾患、例えば  $\text{HNF} - 1 \alpha$  が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患、具体的にはインシュリンおよび／または  $\text{GLUT} 2$  などの減少に起因する疾患、より具体的には糖尿病あるいは肝細胞腺腫または肝細胞癌などの防止剤



および／または治療剤の処方は、適当な医薬担体と組合わせて処方することが好ましい。かかる処方は、治療上有効量の上記ペプチド、抗体、化合物、HNF-1 $\alpha$ 分解阻害剤、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物、例えばインシュリン遺伝子および／またはGLUT2遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤、並びにHNF-1 $\alpha$ の分解に起因する疾患、例えばHNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患、具体的にはインシュリンおよび／またはGLUT2などの減少に起因する疾患、より具体的には糖尿病あるいは肝細胞腺腫または肝細胞癌などの防止剤および／または治療剤に、さらに医薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる担体としては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限らない。処方は投与経路に適したものを選択すればよく、該処方は当業者によく知られている。また、処方するときには、これらを単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。

#### 【0036】

投与形態は、全身投与であっても局所投与であってもよい。全身投与の好ましい態様は、注射、例えば静脈注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。投与の別の態様は、腸溶処方またはカプセル処方がうまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜投与若しくは経皮投与を用いることもできる。局所的な投与においては、膏薬、パスタ、ゲルなどの形態での投与であってもよい。

#### 【0037】

必要な用量範囲は、上記ペプチド、抗体、化合物、HNF-1 $\alpha$ 分解阻害剤、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物、例えばインシュリン遺伝子および／またはGLUT2遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤、並びにHNF-1 $\alpha$ の分解に起因する疾患、例えばHNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患、具体的にはインシュリンおよび／またはGLUT2の減少に起因する疾患、より具体的には糖尿病あるいは肝細胞

腺腫または肝細胞癌の防止剤および／または治療剤の有効性、投与経路、処方の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重 1 kg あたり 0.1  $\mu$ g 乃至 100  $\mu$ g の範囲である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

#### 【0038】

製剤化にあたっては、例えばペプチド、蛋白質、オリゴヌクレオチド、抗体、化合物など各対象の物性に応じた公知の製剤化手段を導入すればよい。具体的には、例えば散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、リポソーム製剤、脂肪乳剤、シクロデキストリンなどの包接体などの製剤化方法が利用できる。

#### 【0039】

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース、マンニトールなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体が用いられる。

#### 【0040】

懸濁剤は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトースなどの糖類、PEG などのグリコール類、油類を使用して製造できる。

#### 【0041】

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

#### 【0042】

リポソーム化は、例えばリン脂質を有機溶媒（クロロホルムなど）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振とう、超音波処理および遠心処理した後、上清をろ過処理して回収することにより行い得る。

## 【0043】

脂肪乳剤化は、例えば当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油などの植物油、MCTなど）、乳化剤（リン脂質など）などを混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型など）を用いて、乳化・均質化処理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類（例えばブドウ糖、ソルビトール、果糖など）が例示される。

## 【0044】

シクロデキストリン包接化は、例えば当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水などに加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿をろ過し、滅菌乾燥することにより行い得る。このとき、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 型）を適宜選択すればよい。

## 【0045】

本発明に係わるペプチドおよび上記同定方法で得られた化合物は、試薬として利用できる。例えばHNF-1 $\alpha$ が関与する転写因子ネットワークについての研究およびHNF-1 $\alpha$ の機能不全や分解に起因する疾患、例えば糖尿病におけるHNF-1 $\alpha$ やカルパインの関与についての分子レベルでの研究などに有用である。

## 【0046】

さらに本発明は、カルパイン、カルパインをコードするポリヌクレオチドおよびカルパインをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、HNF-1 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ をコードするポリヌクレオチドおよびHNF-1 $\alpha$ をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キットを提供する。当該試薬キットは、例えば本発明に係る同定方法に使用できる。

## 【0047】

上記試薬キットは、カルパインとHNF-1 $\alpha$ の分解を検出するためのシグナ

ルおよび／またはマーカー、バッファー、並びに塩など、必要とされる物質を含むことができる。さらに、安定化剤および／または防腐剤などの物質を含んでもよい。製剤化にあたっては、使用する各物質それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

#### 【0048】

##### 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

#### 【0049】

##### 【実施例1】

(カルパインによるヒトHNF-1 $\alpha$ の分解)

m-カルパインおよび $\mu$ -カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解を、インビトロ蛋白質分解試験で検討した。

#### 【0050】

##### <材料>

$\mu$ -カルパインはヒト由来のもの (Calpain 1, human erythrocytes, Calbiochem社) を使用した。m-カルパインはウサギ由来のもの (PROTEASE, Calcium Activated Neutral calpain, Sigma社) およびラット由来のもの (Calpain 2, rat recombinant, E. coli, Calbiochem社) を使用した。

#### 【0051】

ヒトHNF-1 $\alpha$ は、HNF-1 $\alpha$ 発現プラスミドを下記のように構築し、該プラスミドを用いて蛋白質の合成を行なうことにより得た。まず、ヒトHNF-1 $\alpha$  cDNAを、ヒト肝polyA<sup>+</sup> RNAから逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) により獲得し、シーケンスにより塩基配列を確認した。その後、N末端にヒスチジンタグ (His-tag) およびExpress-tagを付加させる動物細胞用発現プラスミドp cDNA3.1/His (Invitrogen社) にEcoRIおよびNotIサイトで組込み、HNF-1 $\alpha$ 発現

プラスミドを構築した。クローニングしたHNF-1 $\alpha$  cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBIデータベースのアクセッション番号NP\_000536（登録遺伝子名はTCF1。）と同一であった。

#### 【0052】

HNF-1 $\alpha$ 発現プラスミドを用い、HNF-1 $\alpha$ 蛋白質の合成を、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega社)を使用してインビトロで行なった。すなわち、HNF-1 $\alpha$ 発現プラスミドとTNT T7 Quick Master Mixを混合し、メチオニン存在下で30℃にて1.5時間インキュベーションしてHNF-1 $\alpha$ を合成した。合成したHNF-1 $\alpha$ に、抗Xpress抗体 (Invitrogen社)を添加して4℃で1時間転倒混和後、Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech社)を加え、4℃でさらに1時間転倒混和することにより免疫沈降を行なった。ついで、遠心処理によりProtein G Sepharoseを回収し、洗浄バッファー (50mM Tris-HCl, pH7.5/150mM NaCl/0.2% ノニデット P-40)で3回洗浄した後に、200mM Tris-HCl (pH7.8)でリンスして20%スラリーとし、HNF-1 $\alpha$ 試料とした（以下HNF-1 $\alpha$ スラリーと称する。）。

#### 【0053】

##### <方法>

インビトロにおける蛋白質分解試験は、HNF-1 $\alpha$ スラリーに $\mu$ -カルパインまたはm-カルパインを添加し、200mM Tris-HCl (pH7.8)/1mM ジチオスレイトール (DTT)/6mM CaCl<sub>2</sub>存在下で37℃にて1時間インキュベーションすることにより行なった。各カルパインの反応系での最終濃度は、ヒト $\mu$ -カルパインは50unit/mL、ウサギm-カルパインは蛋白質濃度として50 $\mu$ g/mL、およびラットm-カルパインは59unit/mLとした。対照実験として、HNF-1 $\alpha$ スラリーをカルパインを添加せずにカルシウム存在下で同様にインキュベーションした。また、カルシウ

ム非存在下での蛋白質分解試験を行なうために、6mM  $\text{CaCl}_2$ の代わりに10mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を添加した試料を作製して同様にインキュベーションした。インキュベーション後の試料は、等容量の2×ドデシル硫酸ナトリウム(SDS) サンプルバッファー〔4% SDS/125mM Tris-HCl, pH6.8/20% グリセロール/0.01% ブロムフェノールブルー(BPB)/10%  $\beta$ -メルカプトエタノール(mercapt ethanol)〕を加えて5分間加熱し、5-20% SDS-PAGEにより分離した。その後、His-Xpress領域を認識する抗Omni/M21抗体/(Santa Cruz社)および抗HNF-1 $\alpha$ 抗体/c-19(Santa Cruz社)を用いてウェスタンブロッティング法によりHNF-1 $\alpha$ を検出した。検出はECL western blotting detection kit(Amersham Pharmacia Biotech社)を使用して行なった。

#### 【0054】

##### <結果>

図2に示したように、ヒト $\mu$ -カルパイン、ウサギm-カルパインおよびラットm-カルパインによるHNF-1 $\alpha$ のインビトロでの分解が認められた。一方、カルシウム非存在下またはm-カルパイン無添加ではHNF-1 $\alpha$ は分解されなかった。以上の結果から、HNF-1 $\alpha$ は $\mu$ カルパインおよびm-カルパインによりカルシウム存在下で分解されることが明らかになった。

#### 【0055】

##### 【実施例2】

(ヒトm-カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解)

ヒトm-カルパインによるヒトHNF-1 $\alpha$ の分解について検討するために、昆虫細胞で発現させたヒトm-カルパインを用いてインビトロ蛋白質分解試験を実施した。

#### 【0056】

##### <材料>

ヒトHNF-1 $\alpha$ は、実施例1で作製したもの(HNF-1 $\alpha$ スラリー)を用

いた。

ヒトm-カルパインは、昆虫細胞で発現させたものを用いた。まず、ヒトm-カルパイン cDNAを、ヒト肝polyA<sup>+</sup> RNA (Clontech社) からRT-PCRにより獲得した。シーケンスにより塩基配列を確認し、PCRエラーと思われる塩基置換はQuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (STARATAGENE社) により修正した。また、ヒトカルパインスモールサブユニット1 cDNA (calpain small subunit 1 cDNA) をヒト骨格筋cDNA (Clontech社) からPCRにより獲得し、シーケンスにより配列を確認した。クローニングしたm-カルパイン cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBIデータベースのアクセッション番号AAA35645 (登録遺伝子名はCAPN2。)と、73番目および74番目のアミノ酸がメチオニン-アルギニン (MR) からイソロイシン-グルタミン酸 (IE) に置換されている以外は同一であった。このIEへの置換はSwiss-Prot (P17655) においてコンフリクト (Conflict) の記載がある。また、カルパインスモールサブユニット1 cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBIデータベースのアクセッション番号NP\_001740 (登録遺伝子名はCAPNS1。)と同一であった。蛋白質発現はバキュロウイルスを用いた昆虫細胞 (夜盗蛾sf-9細胞) 発現系にて行なった。すなわち、各々のcDNAをpFastBac DUALプラスミド (Invitrogen社) に組込み、Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems (Invitrogen社) を用いて、sf-9細胞にm-カルパインおよびカルパインスモールサブユニット1を共発現させた。これら蛋白質を発現させたsf-9細胞は、冷却したリン酸緩衝生理食塩水 (以下、PBSと称する。) で洗浄後、凍結融解により破碎した。ついで、20mM Tris-HCl (pH7.5) / 5mM EDTA / 10mM  $\beta$ -メルカプトエタノールを添加し、氷中で超音波処理した後に遠心処理 (15,000rpm×30分間) し、その上清を活性体試料 (細胞ライセートと称する。) とした。また、蛋白質非発現sf-9細胞のライセートを同様に調製し、陰性対照として使用した。ライセートのm-カルパイン活性の有

無は、基質としてカゼインを用いて確認した（非特許文献30）。また、陽性対照としてラットm-カルパインを用いた。

#### 【0057】

##### <方法>

インビトロ蛋白質分解試験は、m-カルパインとして、m-カルパインおよびカルパインスモールサブユニット1を共発現させたsf-9細胞のライセートを用いた以外は、実施例1と同様の方法で行なった。これら蛋白質を発現させたsf-9細胞ライセートの反応系における最終濃度は、蛋白質濃度として1.75mg/mLとした。ラットm-カルパインの反応系での最終濃度は59unit/mLとした。HNF-1 $\alpha$ の検出は、抗HNF-1 $\alpha$ 抗体/C-19（Santa Cruz社）のみを用いた以外は実施例1と同様の方法で行なった。

#### 【0058】

##### <結果>

図3に示すように、ヒトm-カルパインによるヒトHNF-1 $\alpha$ の分解が認められた。一方、カルシウム非存在下、非発現sf-9細胞ライセート（図中、コントロールsf-9細胞ライセートと表示）およびカルパイン無添加（図中、対照と表示）ではいずれもHNF-1 $\alpha$ の分解が認められなかった。これらから、HNF-1 $\alpha$ はヒトm-カルパインによりカルシウム存在下で分解されることが明らかになった。

#### 【0059】

##### 【実施例3】

（イオノフォア添加によるヒトHNF-1 $\alpha$ の分解）

細胞内におけるHNF-1 $\alpha$ のカルパインによる分解を検討するため、カルシウムイオノフォア添加によるHNF-1 $\alpha$ 分解試験を実施した。

#### 【0060】

##### <方法>

細胞数 $0.8 \times 10^6$ のHEK293T細胞を37℃にて5%CO<sub>2</sub>存在下で5時間培養した後（直径60mmシャーレ）、2 $\mu$ gのHNF-1 $\alpha$ 発現プラスミド（実施例1参照）をFuGENE6 Transfection Reagent



ent (Roche社) を用いてトランスフェクションした。2日間培養後、イオノフォア A23187 (4-bromo-calcium ionophore A23187, Sigma社)  $10\mu\text{g/mL}$  および 0.2% ジメチルスルホキシド (DMSO) 含有培地と交換し、4時間培養した。陰性対照群は 0.2% DMSO 含有培地と交換した。所定時間培養後、細胞を冷却した PBS (-) で洗浄し、 $350\mu\text{l}$  の低張細胞溶解バッファー [ $10\text{mM}$  HEPES,  $\text{pH} 7.5$  /  $10\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  /  $42\text{mM}$   $\text{KCl}$  /  $1\text{mM}$  フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)] に懸濁した後、氷上で 20 分間放置した。細胞をホモジナイザーで破碎後、 $4^\circ\text{C}$  にて  $600\text{g}$  で 10 分間遠心処理し、その上清を細胞質画分、沈殿を核画分として回収した。核画分はさらに  $2\times\text{PBS}$  / 1% ノニデット P-40 / 0.1% SDS からなる溶液に懸濁し、超音波処理にて破碎した。細胞画分は、Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit (PIERCE社) により蛋白質濃度を測定した。作成した各試料は等量の  $2\times\text{SDS}$  サンプルバッファーを加え、5 分間加熱後、その上清を 5-20% SDS-PAGE により分離した。HNF-1 $\alpha$  の検出は、実施例 3 と同様の方法で行なった。

#### 【0061】

##### <結果>

図 4 に示したように、イオノフォア添加により HNF-1 $\alpha$  の分解が認められた。このことから、HNF-1 $\alpha$  は、細胞内においてカルシウム濃度の上昇に伴い、カルシウムイオン依存性システインプロテアーゼであるカルパインによって分解されたと考えられる。

#### 【0062】

##### 【発明の効果】

本発明においては、m-カルパインおよび  $\mu$ -カルパインが HNF-1 $\alpha$  を切断し分解することを初めて明らかにした。HNF-1 $\alpha$  は転写因子であり、種々の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーに結合し、当該遺伝子の転写を活性化する。HNF-1 $\alpha$  が、インシュリン、GLUT2 およびグルコキナーゼなどの糖代謝関連因子の発現に関与していること、および遺伝性 2 型糖尿病の原因遺

伝子であることが知られていることなどから、HNF-1 $\alpha$ の減少や機能欠損が糖尿病に関与すると考えられる。また、HNF-1 $\alpha$ と、肝細胞癌への形質転換の危険性を有する肝細胞腺腫との関連が報告されている。したがって、本発明において提供するHNF-1 $\alpha$ 分解阻害剤および／またはHNF-1 $\alpha$ 分解阻害方法により、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進、例えばインシュリン遺伝子および／またはGLUT2遺伝子の遺伝子産物の産生促進が可能になる。また、HNF-1 $\alpha$ が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止および／または治療が可能になる。具体的には、例えばインシュリンおよび／またはGLUT2の減少に起因する疾患、より具体的には糖尿病などの防止および／または治療が可能である。あるいは、本発明により肝細胞腺腫や肝細胞癌の防止および／治療が可能である。このように本発明は、HNF-1 $\alpha$ の過剰な分解に起因する疾患の防止および／または治療のために非常に有用である。

### 【0063】

#### 【配列表フリーテキスト】

配列番号1：不確定

X a a のコドンは t a t であると多くの報告において示されていることから、X a a は T y r であるかもしれない。

【 0 0 6 4 】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

CELESTAR LEXICO-SCIENCES, INC.

<120> A system and method of degradation of hepatocyte nuclear factor 1  
alpha, and a method and agent for inhibiting the degradation of the same

&lt;130&gt; NP03-1021

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 631

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (322)..(322)

&lt;223&gt; UNSURE

Xaa may be Tyr since it has been shown in many reports that the  
codon of Xaa is tat.

&lt;400&gt; 1

Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu  
1 5 10 15

Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu  
20 25 30

Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Ala Gly Glu Gly Pro Leu Asp Lys Gly Glu  
35 40 45

Ser Cys Gly Gly Gly Arg Gly Glu Leu Ala Glu Leu Pro Asn Gly Leu  
50 55 60

Gly Glu Thr Arg Gly Ser Glu Asp Glu Thr Asp Asp Asp Gly Glu Asp  
65 70 75 80

Phe Thr Pro Pro Ile Leu Lys Glu Leu Glu Asn Leu Ser Pro Glu Glu  
85 90 95

Ala Ala His Gln Lys Ala Val Val Glu Thr Leu Leu Gln Glu Asp Pro  
100 105 110

Trp Arg Val Ala Lys Met Val Lys Ser Tyr Leu Gln Gln His Asn Ile  
115 120 125

Pro Gln Arg Glu Val Val Asp Thr Thr Gly Leu Asn Gln Ser His Leu  
130 135 140

Ser Gln His Leu Asn Lys Gly Thr Pro Met Lys Thr Gln Lys Arg Ala  
145 150 155 160

Ala Leu Tyr Thr Trp Tyr Val Arg Lys Gln Arg Glu Val Ala Gln Gln  
165 170 175

Phe Thr His Ala Gly Gln Gly Gly Leu Ile Glu Glu Pro Thr Gly Asp  
180 185 190

Glu Leu Pro Thr Lys Lys Gly Arg Arg Asn Arg Phe Lys Trp Gly Pro  
195 200 205

Ala Ser Gln Gln Ile Leu Phe Gln Ala Tyr Glu Arg Gln Lys Asn Pro  
210 215 220

Ser Lys Glu Glu Arg Glu Thr Leu Val Glu Glu Cys Asn Arg Ala Glu  
225 230 235 240

Cys Ile Gln Arg Gly Val Ser Pro Ser Gln Ala Gln Gly Leu Gly Ser  
245 250 255

Asn Leu Val Thr Glu Val Arg Val Tyr Asn Trp Phe Ala Asn Arg Arg  
260 265 270

Lys Glu Glu Ala Phe Arg His Lys Leu Ala Met Asp Thr Tyr Ser Gly  
275 280 285

Pro Pro Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Ala Leu Pro Ala His Ser Ser  
290 295 300

Pro Gly Leu Pro Pro Pro Ala Leu Ser Pro Ser Lys Val His Gly Val  
305 310 315 320

Arg Xaa Gly Gln Pro Ala Thr Ser Glu Thr Ala Glu Val Pro Ser Ser  
325 330 335

Ser Gly Gly Pro Leu Val Thr Val Ser Thr Pro Leu His Gln Val Ser

340

345

350

Pro Thr Gly Leu Glu Pro Ser His Ser Leu Leu Ser Thr Glu Ala Lys

355

360

365

Leu Val Ser Ala Ala Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Ser Thr Leu Thr

370

375

380

Ala Leu His Ser Leu Glu Gln Thr Ser Pro Gly Leu Asn Gln Gln Pro

385

390

395

400

Gln Asn Leu Ile Met Ala Ser Leu Pro Gly Val Met Thr Ile Gly Pro

405

410

415

Gly Glu Pro Ala Ser Leu Gly Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly Ala Ser

420

425

430

Thr Leu Val Ile Gly Leu Ala Ser Thr Gln Ala Gln Ser Val Pro Val

435

440

445

Ile Asn Ser Met Gly Ser Ser Leu Thr Thr Leu Gln Pro Val Gln Phe

450

455

460

Ser Gln Pro Leu His Pro Ser Tyr Gln Gln Pro Leu Met Pro Pro Val  
465 470 475 480

Gln Ser His Val Thr Gln Ser Pro Phe Met Ala Thr Met Ala Gln Leu  
485 490 495

Gln Ser Pro His Ala Leu Tyr Ser His Lys Pro Glu Val Ala Gln Tyr  
500 505 510

Thr His Thr Gly Leu Leu Pro Gln Thr Met Leu Ile Thr Asp Thr Thr  
515 520 525

Asn Leu Ser Ala Leu Ala Ser Leu Thr Pro Thr Lys Gln Val Phe Thr  
530 535 540

Ser Asp Thr Glu Ala Ser Ser Glu Ser Gly Leu His Thr Pro Ala Ser  
545 550 555 560

Gln Ala Thr Thr Leu His Val Pro Ser Gln Asp Pro Ala Gly Ile Gln  
565 570 575



His Leu Gln Pro Ala His Arg Leu Ser Ala Ser Pro Thr Val Ser Ser

580

585

590

Ser Ser Leu Val Leu Tyr Gln Ser Ser Asp Ser Ser Asn Gly Gln Ser

595

600

605

His Leu Leu Pro Ser Asn His Ser Val Ile Glu Thr Phe Ile Ser Thr

610

615

620

Gln Met Ala Ser Ser Ser Gln

625

630

**【図面の簡単な説明】**

【図1】 m-カルパインまたは $\mu$ -カルパインによるHNF-1 $\alpha$ （配列番号1）の切断認識部位を示す図である。アミノ酸配列は1文字表記し、切断認識部位は下線で示した。

【図2】 ヒト $\mu$ -カルパイン、ウサギm-カルパインおよびラットm-カルパインが、インビトロでヒトHNF-1 $\alpha$ をカルシウム存在下で分解したことを示す図である。対照は、カルパイン無添加の試料を表わす。図中の+および-はカルシウムの有無を示している。上図および下図はそれぞれ、抗Omn i/M21抗体および抗HNF-1 $\alpha$ 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果であり、矢頭はHNF-1 $\alpha$ のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

【図3】 ヒトm-カルパインがインビトロでヒトHNF-1 $\alpha$ をカルシウム存在下で分解したことを示す図である。ヒトm-カルパインとカルパインスモールサブユニット1とを共発現させた昆虫細胞のライセートをヒトm-カルパインとして用いた。陰性対照としてカルパイン非発現の昆虫細胞ライセート（図中ではコントロールSf-9細胞ライセートと表示。）およびライセート無添加試料（図中では対照と表示。）を用い、陽性対照としてラットm-カルパインを用いた。図中の+および-はカルシウムの有無を示している。図は抗HNF-1 $\alpha$ 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果であり、矢頭はHNF-1 $\alpha$ のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

【図4】 イオノフォアの添加により細胞内でHNF-1 $\alpha$ が分解されたことを示す図である。図は抗HNF-1 $\alpha$ 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果であり、アスタリスク（\*）はHNF-1 $\alpha$ の分解物のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

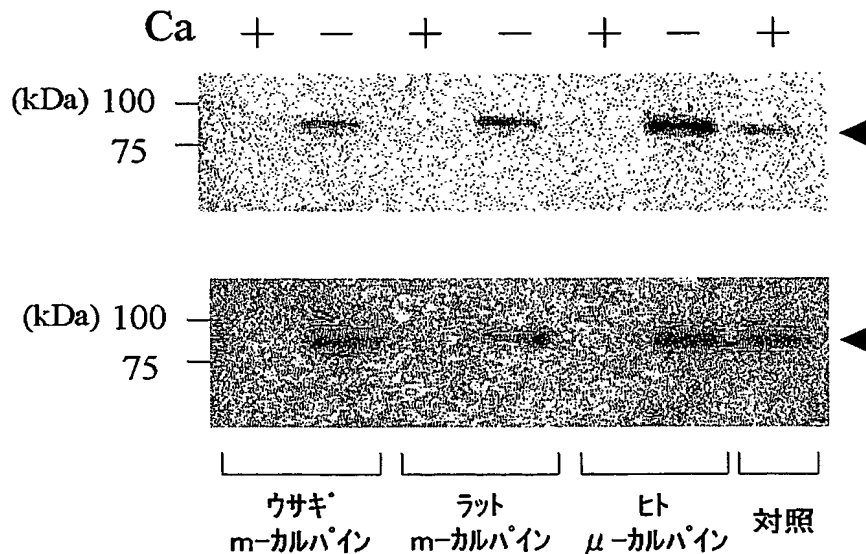
【書類名】

図面

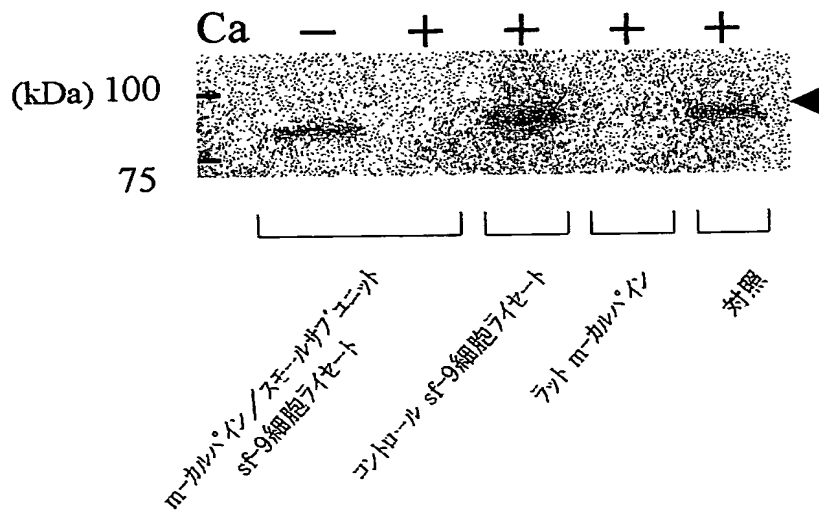
【図 1】

1 MVS~~K~~LSQLQT ELLAALLES~~G~~ LSKEALIQAL GEPGPYLLAG EGPLDKGES~~C~~ GGGRGELAE~~L~~  
61 P~~N~~GLGETRGS EDE~~T~~DD~~D~~GED FT~~P~~PILKELE NLSPEEAHQ KAVVETLLQE DPWRVAKMV~~K~~  
121 SYLQQHNI~~P~~Q REVVD~~T~~TGLN QSHLSQH~~L~~NK GTPMKTQKRA ALYTWYVRKQ REVAQQFTHA  
181 GGGGLIEEPT GDELPTKKGR RNRFKWGPAS QQILFQAYER QKNPSKEERE TLVEECNRAE  
241 CIGRGVSPSQ AQGLGSNLVT EVRVYNWFAN RRKEEAFRHK LAMDTYSGPP PGP~~G~~PGPALP  
301 AHSSPGLPPP ALSPSKVHGV RXGQPATSET AEPSSSSGGP LVTVSTPLHQ VSPTGLEPSH  
361 SLLSTEAKLV SAAGGPLPPV STLTALHSLE QTSPGLNQQP QNLIMASLPG VMTIGPGEP~~A~~  
421 SLGPTFTNTG ASTLVIGLAS TQAQSV~~P~~VIN SMGSSLTTLQ PVQFSQPLHP SYQQ~~P~~LMPPV  
481 QSHVTQSPFM ATMAQLQSPH ALYSHKPEVA QYTHTG~~L~~LQP TMLITDTTNL SALASLTPTK  
541 QVFTSDTEAS SESGLHTPAS QATT~~L~~HVPSQ DPAGIQHLQP AHRLSASPTV SSSSLVLYQS  
601 SDSSNGQSHL LPSNHSVIET FISTQMASSS Q

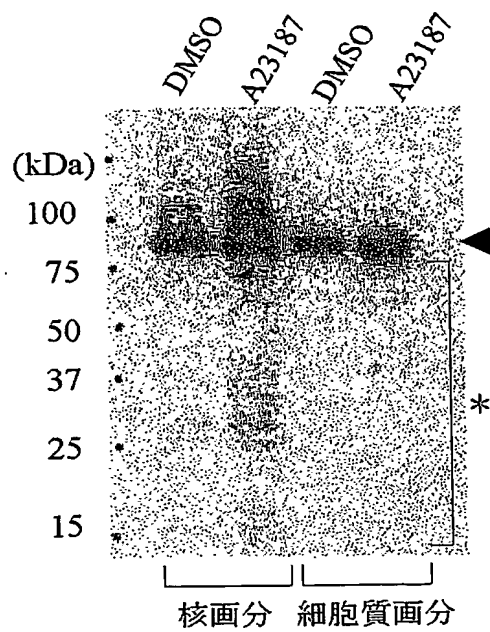
【図 2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ ) の分解に関与する蛋白質を見出し、HNF-1 $\alpha$  の分解に起因する疾患の防止手段および／または治療手段を提供すること。

【解決手段】 m-または $\mu$ -カルパインがHNF-1 $\alpha$  を分解することを見出したことに基づいて、HNF-1 $\alpha$  の分解方法、HNF-1 $\alpha$  分解剤、HNF-1 $\alpha$  の分解阻害方法、HNF-1 $\alpha$  分解阻害剤、HNF-1 $\alpha$  が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤および産生促進方法、HNF-1 $\alpha$  分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤並びに防止方法および／または治療方法、カルパインによるHNF-1 $\alpha$  分解を阻害する化合物の同定方法、該同定方法で得られた化合物、さらにカルパイン、HNF-1 $\alpha$ 、これらをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターを含んでなる試薬キットを提供する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 0 9 6 3 7 1
受付番号	5 0 3 0 0 5 3 4 8 4 6
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 4 月 1 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成 1 5 年 3 月 3 1 日
-------	--------------------

次頁無

特願 2003-096371

出願人履歴情報

識別番号

[500520628]

1. 変更年月日

2000年10月26日

[変更理由]

新規登録

住所

千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD  
17

氏名

セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

特願 2003-096371

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002831]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

氏 名

第一製薬株式会社